

09/308027

PCT/JP97/04129

日本国特許庁

12.11.97

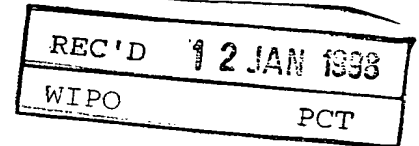
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1996年11月13日



出願番号  
Application Number:

平成 8 年特許願第 302053 号

出願人  
Applicant(s):

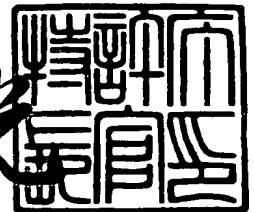
明治乳業株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1997年12月19日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

荒井寿光



出証番号 出証特平09-3104791

【書類名】	特許願
【整理番号】	M1-808
【提出日】	平成 8年11月13日
【あて先】	特許庁長官 殿
【国際特許分類】	C12N 13/00
【発明の名称】	ペプチド免疫療法治療剤
【請求項の数】	12
【発明者】	
【住所又は居所】	神奈川県伊勢原市高森 6 1 1    ラメール壺番館 1 0 5 号
【氏名】	曾根 敏雄
【発明者】	
【住所又は居所】	神奈川県小田原市成田 5 4 0 番地明治乳業株式会社ヘル スサイエンス研究所内
【氏名】	衆 晃智
【発明者】	
【住所又は居所】	神奈川県小田原市成田 5 4 0 番地明治乳業株式会社ヘル スサイエンス研究所内
【氏名】	大力 一雄
【発明者】	
【住所又は居所】	神奈川県小田原市成田 5 4 0 番地明治乳業株式会社ヘル スサイエンス研究所内
【氏名】	紀 光助
【特許出願人】	
【識別番号】	000006138
【氏名又は名称】	明治乳業株式会社
【代表者】	中山 悠
【代理人】	
【識別番号】	100102978
【弁理士】	

【氏名又は名称】 清水 初志

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9600629

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ペプチド免疫療法治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アレルゲン由来の特定の抗原ペプチドと結合する特定のHLAクラスII分子を有するアレルギー患者に適用するための、該特定の抗原ペプチドを有効成分とするペプチド免疫療法治療剤。

【請求項2】 アレルゲンがスギ花粉アレルゲンCry j 1及び／又はCry j 2である、請求項1記載のペプチド免疫療法治療剤。

【請求項3】 抗原ペプチドが、Cry j 1由来のp106-120（配列番号：3）若しくはp109-117（配列番号：4）またはCry j 2由来の抗原ペプチドp66-80（配列番号：14）若しくはp236-250（配列番号：19）であり、特定のHLAクラスII分子が、DRB5\*0101である、請求項2記載のペプチド免疫療法治療剤。

【請求項4】 抗原ペプチドが、Cry j 2由来の抗原ペプチドp186-200（配列番号：18）であり、特定のHLAクラスII分子がDRB4\*0101である、請求項2記載のペプチド免疫療法治療剤。

【請求項5】 抗原ペプチドが、Cry j 1由来の抗原ペプチドp16-30（配列番号：1）、p146-160（配列番号：5）、p191-205（配列番号：7）、p251-265（配列番号：9）若しくはp326-340（配列番号：10）またはCry j 2由来の抗原ペプチドp326-340（配列番号：21）若しくはp341-355（配列番号：23）であり、特定のHLAクラスII分子がDQA1\*0102-DQB1\*0602である、請求項2記載のペプチド免疫療法治療剤。

【請求項6】 抗原ペプチドが、Cry j 1由来の抗原ペプチドp61-75（配列番号：2）若しくはp211-225（配列番号：8）またはCry j 2由来の抗原ペプチドp81-95（配列番号：15）であり、特定のHLAクラスII分子がDPA1\*0101-DPB1\*0501である、請求項2記載のペプチド免疫療法治療剤。

【請求項7】 抗原ペプチドが、Cry j 2由来の抗原ペプチドp336-350（配列番号：22）であり、特定のHLAクラスII分子がDPA1\*0202-DPB1\*0501である、請求項2記載のペプチド免疫療法治療剤。

【請求項8】 抗原ペプチドが、Cry j 2由来の抗原ペプチドp181-195（配

列番号：17)であり、特定のHLAクラスII分子がDPA1\*0101-DPB1\*0201である、請求項2記載のペプチド免疫療法治療剤。

【請求項9】 抗原ペプチドが、Cry j 1由来の抗原ペプチドp151-165（配列番号：6）若しくはp191-205（配列番号：7）またはCry j 2由来の抗原ペプチドp16-30（配列番号：12）、p151-165（配列番号：16）若しくはp321-335（配列番号：20）であり、特定のHLAクラスII分子がDRB1\*0901である、請求項2記載のペプチド免疫療法治療剤。

【請求項10】 抗原ペプチドが、Cry j 2由来の抗原ペプチドp36-50（配列番号：13）またはp236-250（配列番号：19）であり、特定のHLAクラスII分子がDRB1\*1501である、請求項2記載のペプチド免疫療法治療剤。

【請求項11】 特定のHLAクラスII分子と特異的に反応する抗原ペプチドを含む、HLAクラスII分子を識別するための検査用試薬。

【請求項12】 Cry j 1由来の抗原ペプチドp16-30（配列番号：1）、p61-75（配列番号：2）、p106-120（配列番号：3）、p109-117（配列番号：4）、p146-160（配列番号：5）、p151-165（配列番号：6）、p191-205（配列番号：7）、p211-225（配列番号：8）、p251-265（配列番号：9）若しくはp326-340（配列番号：10）、またはCry j 2由来の抗原ペプチドp16-30（配列番号：12）、p36-50（配列番号：13）、p66-80（配列番号：14）、p81-95（配列番号：15）、p151-165（配列番号：16）、p181-195（配列番号：17）、p186-200（配列番号：18）、p236-250（配列番号：19）、p321-335（配列番号：20）、p326-340（配列番号：21）、p336-350（配列番号：22）若しくはp341-355（配列番号：24）を含む、HLAクラスII分子を識別するための検査用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【従来技術】

アレルギー反応とは、抗原と抗体、または感作細胞が反応した結果生体におこる異常な免疫反応である。アレルギー反応を引き起こす抗原はとくにアレルゲンと呼ばれ、植物の花粉、ダニ、動物の表皮、昆虫、食物、薬物、化学物質など数多く存

在する。アレルギー反応は、一般に、アレルゲンに対する即時型反応と、それに続く遅発型反応からなる二相性の反応により特徴づけられる。初期のアレルギー反応においては、アレルゲン特異的IgE抗体が、末梢血中の好塩基球および組織のマスト細胞に固着し、引き続くアレルゲンの侵入により、アレルゲンを介してIgE抗体が好塩基球やマスト細胞上で架橋し、その結果、ヒスタミン、プロスタグランジン、およびロイコトリエンを含む炎症性メディエーターが放出される。これらの炎症性メディエーターに応答して、局所に集積したリンパ球、単球、好塩基球および好酸球が活性化され、組織に障害を含むさまざまな反応をもたらすメディエーターを遊離することにより、遅発型反応が引き起こされる。

## 【0002】

一方、アレルギー反応がサイトカインによって制御されていることも現在、よく知られている。それは、IgE産生の制御のみならず、エフェクター細胞の活性化や分化に関与している。この考えは、例えば、アレルギー患者に対する減感作療法において、患者の臨床症状の軽減にも拘わらず、アレルゲン特異的IgEのレベルが変わらないという観察により支持されている。

## 【0003】

ここで減感作療法とは、アレルギー患者に少量の抗原（例えば、スギ花粉またはダニから抽出した抗原）を投与し、以後、抗原の投与量を漸増していく、アレルギー疾患の治療方法の一つである。減感作療法の成功は、アレルゲン特異的T細胞の応答が減少していることと関連している。つまり減感作療法を行うことにより抗原に対するT細胞不応答（T細胞アナジー）が生じ、その結果、アレルギーカスケードを進展させるのに重要なサイトカインが産生されないと考えられる。このようなことから、アレルギー研究に関する研究は、アレルゲン特異的免疫応答における初期の反応、特にT細胞によるアレルギー反応制御のメカニズムの解明に焦点があてられている。アレルゲンを含む外来抗原に対する免疫応答の開始は、免疫システムの抗原提示細胞に依存する。B細胞、マクロファージ、及び樹状細胞を含む抗原提示細胞は、外来抗原を取り込み、抗原ペプチド（T細胞エピトープペプチド）まで断片化してMHCクラスII（ヒトではHLAクラスII）とともに細胞表面に表現し、抗原特異的CD4陽性ヘルパーT細胞（Th細胞）に抗原

提示する。

【0004】

ところで、HLAクラスII分子（DR、DQ、DP）は、 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖とからなる細胞膜抗原である。DR分子の $\alpha$ 鎖はHLA-DRA、 $\beta$ 鎖はHLA-DRB1、HLA-DRB3、HLA-DRB4またはHLA-DRB5遺伝子によりコードされ、DQ分子の $\alpha$ 鎖はHLA-DQA1、 $\beta$ 鎖はHLA-DQB1遺伝子によりコードされ、DP分子の $\alpha$ 鎖はHLA-DPA1、 $\beta$ 鎖はHLA-DPB1遺伝子によりコードされている。HLA-DRAを除く各々の遺伝子は多くの対立遺伝子を含み、 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖とで形成される抗原ペプチドを収容するポケットは高度の多型性を示しその構造が微妙に異なる。その結果、ポケットに結合しT細胞に提示される抗原ペプチドの種類はおのずとその構造に制限される。これが免疫応答の個体差であると考えられている。

【0005】

HLAクラスII拘束性の抗原情報をT細胞レセプター（TCR）を介して受け取ったTh細胞は活性化し、種々のサイトカインを分泌することにより自ら増殖するとともに、B細胞を形質細胞に分化させ、抗体産生を誘導する。この際T細胞活性化のためには、TCR以外の分子を介する第2のシグナル（costimulatory signal）が必要であり、このシグナルがなければ逆に抗原に対してTh細胞の免疫寛容が誘導される場合もあることが知られている（June, C. et al.: Immunol Today. 15: 321, 1994）。

【0006】

アレルゲンに対するT細胞応答の減少と減感作療法の成功との間には関連がある。例えば、10年間にわたり有効な減感作療法を受けてきたブタクサアレルゲン「Amb a 1」に対するアレルギー患者の当該アレルゲンに対するインビトロにおけるT細胞応答は、未処置の患者の応答に比較して劇的に減少していた。同様な例として、ネコ表皮アレルゲン「Fel d 1」に対するアレルギー患者は、減感作療法が効果を発揮するにつれて「Fel d 1」特異的T細胞応答の減少が明らかに観察され、それは皮膚テストに対する感受性の減少と対応していた。また、この治療期間中、「Fel d 1」特異的IgGやIgE抗体は変化しなかった。これらの結果は、抗原特異的T細胞を直接ターゲットとしたアレルギーに対する治療薬作製

の可能性を示すものであった。

【0007】

一方、生化学的な分離、分析技術の発展に伴って数多くのアレルゲンの精製がなされ、またここ数年間は、分子生物学、遺伝子工学の手法が取り入れられ、現在100種類以上のアレルゲンの遺伝子がクローニングされそれらの1次構造が決定されている。そして、そのうちのいくつかについてはT細胞エピトープ部位が同定されている。

【0008】

その結果、アレルゲンのT細胞エピトープを含むペプチドを用いた新たなペプチド免疫療法組成物が開示されている（特表平7-502890号公報、特表平8-502163号公報、特表平8-507436号公報参照）。ネコアレルゲン「Fel d 1」については「Fel d 1」分子上のT細胞エピトープの全てではなく、そのうちのいくつかを含むペプチドをマウスに皮下投与すると、その後の全長「Fel d 1」のチャレンジに対して、抗原特異的T細胞寛容が誘導されたことが報告されている（Briner, T. J. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7608-7612, 1994）。しかし、主要T細胞エピトープのみで、全長アレルゲンのチャレンジに対するT細胞応答を減少させるのに十分であり、そのことが実際にアレルギーの臨床症状の改善に結びつくかどうかは、ヒトによる臨床試験で確認されなければならない。

【0009】

アレルゲン分子上には、T細胞エピトープ部位が分子あたり約3～16ヶ所存在し、個々の患者で認識されるT細胞エピトープ部位は約1～7ヶ所であるといわれている。個々の患者でHLAクラスIIタイプが異なる場合には、患者間で認識されるT細胞エピトープ部位は患者ごとに異なり、タイプが同一の場合には、同一のT細胞エピトープ部位が認識される。従って、ある特定の患者集団が認識するアレルゲン分子上の主要エピトープのみを含むペプチドを用いた上記ペプチド免疫療法では、全ての患者に対する有効性が期待できないと考えられる。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】



本発明は、アレルギー患者個人ごとに有効なペプチド免疫療法治療剤を提供することを課題とする。

【0011】

また、本発明は、アレルギー患者個人ごとに有効なペプチド免疫療法治療剤を選択する際に用いられる、患者のHLAクラスII分子のタイピングのための検査用試薬を提供することを課題とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、個々の患者によって認識されるアレルゲン分子上のT細胞エピトープが異なることに着目した。そして、アレルゲン分子上の種々のT細胞エピトープと、それらを拘束する患者のHLAクラスII分子のタイプとを関連づける手法を確立し、スギ花粉アレルゲンである「Cry j 1」と「Cry j 2」について、アレルゲン分子上の種々のT細胞エピトープと、それらを拘束する患者のHLAクラスII分子のタイプとの関連づけを、以下のように行った。

【0013】

アレルゲン分子上のT細胞エピトープ部位は、現在、DR、DQ及びDPのそれぞれについて、HLA結合モチーフが決定 (Rammensee, H.G. et al.: Immunogenet. 41:178-228, 1995) されていることから、アレルゲン分子の一次構造を調べ、HLA結合モチーフの有無を検討することにより、アレルゲン分子上のT細胞エピトープ部位を推測することができる。従って、構築するペプチド中にT細胞エピトープが含まれる可能性を最大にするために、既知のHLA結合モチーフによるエピトープ部位を推定し、該推定部位を利用してペプチドを構築することが好ましいといえる。しかし、あるHLA結合モチーフを有するペプチドが必ずしもアレルギー疾患を発症するとは限らない。推定はあくまでも推定であって、ペプチド免疫療法に有効な抗原ペプチドは、少なくともT細胞（末梢血リンパ球、T細胞ラインあるいはT細胞クローン）を用いた実験によって決定することが必要である。そこで、本発明者らは、実験によって、実際にペプチド免疫療法に有効な抗原ペプチドを、各HLAのタイプごとに同定した。

【0014】

本発明者らは、ある特定のアレルゲンに感受性を示す患者由来の末梢血リンパ球、T細胞ラインまたはT細胞クローンを、当該アレルゲンの全一次構造をカバーする約15～30残基からなるオーバーラップペプチド（オーバーラップ部分は約5～10残基）および抗原提示細胞と共に培養し、これらのペプチドに対するT細胞の応答を、例えば $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込み量（細胞の増殖応答）によって測定し、応答のあったペプチドを、本発明の少なくとも1つのT細胞エпитープを含む抗原ペプチドと同定した。そして、様々なT細胞ラインまたはT細胞クローンを用いて、T細胞エпитープとそれらを拘束する患者のHLAクラスII分子のタイプとの関連づけを多数行うことに成功した。

## 【0015】

次に、本発明者らは、特定のマウスが認識するT細胞エпитープを同定した。そして、該T細胞エпитープをあらかじめ投与することによって、該特定のマウスにおいて、該T細胞エпитープを含むペプチドに対する免疫反応が有意に抑制されることを見いだした。そして、そのことから、拘束分子の同定されたT細胞エпитープを含むペプチドの中から、患者に固有のHLAクラスII分子のタイプに適合したT細胞エпитープペプチドを選定することによって、患者個人ごとに有効なペプチド免疫療法治療剤が提供されることに想到し、本発明を完成した。

## 【0016】

また、本明細書記載の方法によって、特定のHLAクラスII分子に反応する特定のT細胞エпитープを見いだすことが可能である。本発明者らは、該特定のT細胞エпитープを、患者のHLAクラスII分子のタイピングのための検査用試薬として用いることに想到し、本発明を完成した。該HLAクラスII分子のタイピングのための検査用試薬は、患者個人ごとに有効なペプチド免疫療法治療剤を選択する際に有効に利用される。

## 【0017】

即ち、本発明は、特許請求の範囲の各請求項に記載の発明からなる。

## 【0018】

なお、本明細書で用いられる用語の意味は以下の通りである。

## 【0019】

「T細胞エピトープ」とは、T細胞レセプターが特異的に認識（又は応答ともいう）する構造を意味する。ここで”認識する”とは、T細胞が活性化されることであり、活性化の状態は、例えば、IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ などのサイトカインの産生やDNA合成を通して、捉えることが可能である。

【0020】

「抗原ペプチド」とは、T細胞エピトープを含む、抗原として機能するペプチドを意味する。

【0021】

「アナジー」とは、リンパ球が抗原により活性化されず、機能的に不活性化した状態をいう。

【0022】

「HLAハプロタイプ」とは、通常特定の集合体として遺伝される、HLAクラス遺伝子座の組み合わせをいう。

【0023】

「連鎖不平衡 (linkage disequilibrium)」とは、異なるHLA遺伝子座の対立遺伝子同士が、偶然から期待されるよりも高頻度で単一の染色体またはハプロタイプ上に認められる場合、それらの異なる遺伝子間に相関が生じるが、このような相関を指す。連鎖不平衡は、その頻度の期待値と観察値との差 ( $\Delta$ ) により定量化される。

【0024】

「HLA結合性アミノ酸モチーフ」とは、特定のHLA分子に結合を示すペプチドは、通常特定の位置に特定のアミノ酸残基を有しているが、このようなHLA結合性ペプチド上のHLA分子への結合に重要なアミノ酸残基 (HLAアンカー残基) の位置、および種類の組み合わせを指す。各HLA対立遺伝子産物ごとにモチーフも異なる。本明細書では単にHLA結合モチーフともいう。

【0025】

【発明の実施の形態】

本発明において、T細胞エピトープをアレルゲン分子上にマッピングするには、例えば、末梢血リンパ球、T細胞ラインまたはT細胞クローンを、当該アレル

ゲンの全一次構造をカバーする約15～30残基からなるオーバーラップペプチド（オーバーラップ部分は約5～10残基）および抗原提示細胞と共に培養し、これらのペプチドに対するT細胞の応答を、例えば $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込み量（細胞の増殖応答）によって測定し、応答のあったペプチドを同定することによって、行うことができる。なお、抗原ペプチドのアミノ末端あるいはカルボキシル末端のアミノ酸残基を順次欠失させたペプチドを合成し、この改変ペプチドに対するT細胞応答の変化を調べることによって、正確なエピトープ部位を同定することができる。また、重複領域を共有する2つ以上のペプチドがT細胞応答を示す場合は、このような重複領域の全部または一部を含む新たなT細胞エピトープペプチドを合成し、同様にT細胞応答の変化を調べることによって、正確なエピトープ部位を同定することができる。本発明の抗原ペプチドは少なくとも7アミノ酸残基を含むことが好ましい。

#### 【0026】

本発明において、抗原ペプチドに対するT細胞の応答の有無の判定は、ペプチドに対するT細胞応答の強さを示す刺激係数（stimulation index, SI）を算出することによって行うことができる。SIは、ペプチドに応答した $[^3\text{H}]$ チミジン取り込み量cpmをペプチドを含まない培地のみのcpmで除した値として算出することができる。本発明のペプチド免疫療法に有用な抗原ペプチドは、SIが少なくとも2.0であり、好ましくは少なくとも2.5であり、より好ましくは少なくとも3.5、最も好ましくは少なくとも5.0の値を有する。

#### 【0027】

本発明の抗原ペプチドは、通常、当該ペプチドのHLAクラスII拘束分子を有するアレルギー患者個人由来の末梢血リンパ球、T細胞ライン、あるいはT細胞クローンに対し、インビトロ増殖活性を有する。また、本発明の抗原ペプチドは、通常、当該ペプチドが由来したアレルゲンに感受性の患者のIgE抗体と反応しない。本発明の抗原ペプチドは、一般に、抗原ペプチドの投与により抗原特異的T細胞アナジーを誘導し、その後の当該抗原ペプチドが由来した組換えアレルゲンまたは天然のアレルゲンによるチャレンジに対し免疫不応答を誘導することができる。さらにまた、あらかじめアレルゲンで感作された個体に対し、本発明の抗

原ペプチドを投与することにより、その後の当該アレルゲンのチャレンジに対して免疫不応答を誘導することができる。これらのことは、本発明の抗原ペプチドが、一般に、インビトロにおいて抗原特異的免疫寛容性を誘導する作用を有し、アレルギー患者に対するペプチド免疫療法に有効であることを示している。

【0028】

抗原ペプチドと結合するアレルギー患者のHLAクラスII分子のタイピングは例えば以下のようにして行うことができる。同定された抗原ペプチド、マイトマイシンC処理した自己由来EBライン〔エプステインバー（Epstein-Barr）ウイルスによりトランスフォームしたB細胞株〕及びT細胞を、抗HLA-DR抗体、抗HLA-DQ抗体または抗HLA-DP抗体と共に培養し、T細胞の増殖応答の抑制の程度を調べ、抗原ペプチドがDR、DQ、DPのいずれの分子により拘束されているかを同定する。同定された拘束分子がDQ、DPの場合には、HLAハプロタイプ既知のEBラインを抗原提示細胞として用いることにより、DQとDPの各タイプの拘束分子を同定することができる（Hori, T. et al.: Tissue Antigen 47:485-491, 1996）。HLAクラスIIDNAタイピングはB細胞株からDNAを抽出し、第11回国際主要組織適合会議で採用されたPCR-SSO法で行う（Tsuji, K., Aizawa, M. & Sashazwuki, T. eds, (1982) HLA-1991 vol.1 pp395-518）。DRに関しては、DRB1<sup>\*</sup>とDRスーパータイプ（DRB3<sup>\*</sup>, DRB4<sup>\*</sup>, DRB5<sup>\*</sup>）が連鎖不平衡にあるため、EBラインを抗原提示細胞とした場合には拘束分子が同定できない。このため、DRB1<sup>\*</sup>あるいはDRスーパータイプの1タイプのみを形質導入し、発現しているマウスL-細胞の形質転換株を抗原提示細胞として使用し拘束分子を同定する。

【0029】

抗原ペプチドとそれらを拘束するHLAクラスII分子との関連について、その具体例を以下にあげる。

【0030】

スギ花粉アレルゲンは、現在主要なアレルゲン「Cry j 1」と「Cry j 2」が単離精製されており、それぞれcDNAが単離され、推定一次構造が開示されている（特表平8-502163号公報、特表平8-505284号公報参照）。さらに「Cry j 1」については、その一次構造に基づき「Cry j 1」分子上のT細胞エピ

トープ部位が同定され、これらエピトープ部位を含むペプチドを有効成分とするスギ花粉症に対する治療用組成物が開示されている（特表平8-502163号）。ところで、スギ花粉症患者の90%以上は「Cry j 1」と「Cry j 2」それぞれに対する特異的IgE抗体を有しており、残り10%弱の患者は、「Cry j 1」又は「Cry j 2」いずれか一方に対する特異的IgE抗体を有しているとの報告がある（Hashimoto, M et al.: Clin. Exp. Allergy. 44:840-841, 1995）。

【0031】

この報告から本発明者らは、「Cry j 1」 T細胞エピトープの単独投与、あるいは「Cry j 2」 T細胞エピトープ単独投与によるペプチド免疫療法では十分な効果が期待できないと考え、例えば、「Cry j 1」 および「Cry j 2」 の両者由来であって、スギ花粉症患者において遺伝子頻度の高いHLA-DRB1\*0501で提示される抗原ペプチドを含み、さらにHLAクラスIIの異なる分子（DR, DQ, DP）で提示される抗原ペプチドを含むスギ花粉症に対するペプチド免疫療法に有効な最小の長さの多重エピトープペプチドを提供している（特願平8-80702号）。

【0032】

この多重エピトープペプチドはアレルギー患者に対して有効率を高めることが期待できるが、当該エピトープペプチドを構成する抗原ペプチドのHLA拘束分子をもたない個人に対しては無効である。個人ごとに有効なペプチド免疫療法は、個人のHLAタイプに適合した抗原ペプチドをその個人に投与することである。

【0033】

これらの抗原ペプチドとアレルギー患者のHLAクラスII拘束分子のタイプとを関連づけた具体例として、スギ花粉症患者の例を挙げると以下ようになる。すなわち、特定のHLAクラスII分子を該分子が結合する抗原ペプチドと関連させて列挙すると、「Cry j 1」由来の抗原ペプチドp106-120（配列番号：3）、p109-117（配列番号：4）及び「Cry j 2」由来の抗原ペプチドp66-80（配列番号：14）、p236-250（配列番号：19）と結合するスギ花粉症患者のDRB5\*0101、「Cry j 2」由来の抗原ペプチドp186-200（配列番号：18）と結合するDRB4\*0101、「Cry j 1」由来の抗原ペプチドp16-30（配列番号：1）、p146-160（配列番号：5）、p191-205（配列番号：7）、p251-265（配列番号：9）、p326-340（

配列番号：10) 及び「Cry j 2」由来の抗原ペプチドp326-340 (配列番号：21) 及びp341-355 (配列番号：23) と結合するDQA1\*0102-DQB1\*0602、「Cry j 1」由来の抗原ペプチドp61-75 (配列番号：2) 及びp211-225 (配列番号：8) 及び「Cry j 2」由来の抗原ペプチドp81-95 (配列番号：15) と結合するDPA1\*0101-DPB1\*0501、「Cry j 2」由来の抗原ペプチドp336-350 (配列番号：22)、「Cry j 2」由来の抗原ペプチドp181-195 (配列番号：17) と結合するDPA1\*0101-DPB1\*0201、「Cry j 1」由来の抗原ペプチドp151-165 (配列番号：6)、p191-205 (配列番号：7) 及び「Cry j 2」由来の抗原ペプチドp16-30 (配列番号：12)、p151-165 (配列番号：16)、p321-335 (配列番号：20) と結合するDRB1\*0901、「Cry j 2」由来の抗原ペプチドp36-50 (配列番号：13)、p236-250 (配列番号：19) と結合するDRB1\*1501などがあげられる。なお、「Cry j 1」由来の抗原ペプチドp106-120 (配列番号：3) のコア配列は、p109-117 (配列番号：4) である。

【0034】

また、Ikagawaら (Ikagawa, S. et al., :J. Allergy Clin. Immunol., 97:53-64, 1996) によって「Cry j 1」抗原ペプチドp335-346 (配列番号：11) がDRB3\*0301により提示されていることが報告されており、また、Horiら (Hori, T. et al., :Tissue Antigens, 47: 481-491, 1996) によって、「Cry j 1」抗原ペプチドp214-222 (配列番号：24) がDPA1\*0202-DPB1\*0501により提示されていることが報告されている。

【0035】

これらの知見から、従来は、抗原の種類により、HLAクラスII遺伝子座 (DR, DQ, DP) レベルで拘束分子に偏りがあり、免疫応答を規定していると想定されていたが、「Cry j 1」または「Cry j 2」由来の抗原ペプチドを提示する拘束分子には、DR, DQ, DP分子が全て使用されており、原則として偏りのないことが明らかとなった。

【0036】

一方、特定の抗原ペプチドが結合するHLAクラスII分子を調べると、「Cry j 1」では、p61-75 (配列番号：2) がDPA1\*0101-DPB1\*0501、p146-160 (配列番号

: 5) ではDQA1\*0102-DQB1\*0602、p211-225 (配列番号: 8) ではDPA1\*0101-DPB1\*0501、「Cry j 2」では、p16-30 (配列番号: 12) がDRB1\*0901、p36-50 (配列番号: 13) がDRB1\*1501、p81-95 (配列番号: 15) がDPA1\*0101-DPB1\*0501、p186-200 (配列番号: 18) がDRB4\*0101、p336-350 (配列番号: 22) がDPA1\*0202-DPB1\*0501が主体であるが、その他に関しては同定した拘束分子以外にも結合する性質をもち、多重結合性ペプチド (Multibinder-peptide) としての性格を有している。

【0037】

また、一般に、特定のHLA分子と結合する抗原ペプチドには、HLA分子との結合のための共通なHLA結合性アミノ酸モチーフが含まれており、これらのHLA結合性モチーフが抗原ペプチドのHLA分子への結合に必要である。それ故、HLA分子には、他のペプチドホルモンレセプターがそれらのリガンドに対して示すような高度の選択的結合性はなく、多種類の潜在的抗原ペプチドがHLA分子と結合し得る。HLAクラスII分子の場合、抗原ペプチドの結合モチーフは、通常、1～2個のアミノ酸を介して飛び石状に配列する3～5個のアミノ酸残基からなっている (Matsushita, S. et al.: J. Exp. Med. 180: 873-883, 1994; Rammensee, H. -G. et al.: Immunogenet. 41: 178-228, 1995)。これら既知のHLAクラスII結合モチーフを用いて、スギ花粉アレルゲン分子の一次構造から、例示のHLAクラスII分子に結合する可能性のある抗原ペプチドをさらに選出することができる。従って、本発明におけるスギ花粉症患者の有する特定のHLAクラスIIタイプと結合する抗原ペプチドは、本発明によって実験的に例示された抗原ペプチドに限定されるものではなく、特定のHLAクラスIIタイプとの結合が予想される抗原ペプチドも含まれる。

【0038】

前述の、特定のHLAクラスIIタイプと結合する抗原ペプチドは、該特定のHLAクラスIIタイプを有する患者に対して、ペプチド免疫療法治療剤として適用することができる。本発明の抗原ペプチドをアレルギー患者に対するペプチド免疫療法に使用する場合は、製薬上許容しうる適当な希釈剤、担体等と組み合わせて使用することができる。投与方法は、注射 (皮下、皮内静脈注射等)、点眼、点鼻、



経口、吸入、経皮、経粘膜などの簡便な方法を用いることができ、投与量は当業者により常法で決定することができる。

## 【0039】

なお、患者個人ごとに有効なペプチド免疫療法治療剤を選択するには、あらかじめ患者の有するHLAクラスIIタイプが特定されていることが好ましい。この患者の有するHLAクラスIIタイプの特定は、HLAクラスII分子と特異的に反応する抗原ペプチドを、HLAクラスII分子を識別するための検査用試薬として利用することによって行うことができる。

## 【0040】

具体的には、アレルギー患者及び健常人のHLAクラスII分子のタイピングは次のようにして行うことができる。HLAクラスII分子は、その高度な多型に基づき、それぞれのHLAクラスII分子に結合する抗原ペプチドのアミノ酸モチーフはHLAクラスIIタイプごとに異なる。それ故に、これら結合モチーフの異なる抗原ペプチドを標識し、HLAクラスII分子への特異的結合を調べることによって、アレルギー患者及び健常人のHLAクラスIIのタイピングが可能である。抗原ペプチドの標識は、当業者公知の方法、すなわち、ラジオアイソトープ、酵素、蛍光物質、発光物質などの標識物質を、抗原ペプチドのHLAアンカーアミノ酸残基を除いた位置のアミノ酸残基（例えばチロシン残基）などに結合させる。あるいは、上記標識物質を結合させたストレプトアビジン（又はアビジン）でビオチン化抗原ペプチドを検出する。また、アレルギー患者の診断は、被験者の末梢血リンパ球を当該アレルゲン由来の種々の抗原ペプチドの存在下で培養し、T細胞の応答を、例えば、培養系に添加した $[^3\text{H}]$ チミジンの取込み量を測定することによって判定することができる。さらにT細胞応答が認められた被験者（アレルギー反応陽性患者）については、T細胞応答を誘導する抗原ペプチドのHLAクラスII拘束分子のタイプが当該アレルゲン感受性の患者のHLAクラスIIタイプであると同定できる。

## 【0041】

この方法で同定されたアレルギー患者のHLAクラスIIタイプと抗原ペプチドとの関連を、アレルギー発症における個々のHLAクラスIIタイプの担う役割につい

ての検討、あるいは、アレルギー患者に対するペプチド免疫療法治療剤調製の際の抗原ペプチド選定の判定材料として用いることができる。

#### 【0042】

HLAクラスII分子のタイプが判明したアレルギー患者個人に対し、当該患者のHLAタイプと適合する抗原ペプチドを選定し、前もって、患者由来の末梢血リンパ球に対する該ペプチドの増殖応答能を測定し、各ペプチドの応答の強さを比較検討して、当該患者に有効なペプチド免疫治療剤を調製することができる。たとえば、本明細書の実施例6に示すスギ花粉症患者PBの所有するHLAクラスIとクラスIIのハプロタイプはA2/24-B39/55-Cw7/w3-DRB1\*1501/0901-DRB4\*0101-DRB5\*0101, DQA1\*0102/0301-DQB1\*0602/0303-DPB1\*0101/0101-DPB1\*0501/0201である。当該患者のペプチド免疫療法に用いる抗原ペプチドを選定する場合、Cry j 1では、DPA1\*0101-DPB1\*0501で提示される抗原ペプチドp211-225（配列番号：8）、DRB5\*0101で提示されるp106-120（配列番号：3）、DQA1\*0102-DQB1\*0602で提示されるp191-205（配列番号：7）あるいはp251-265（配列番号：9）が対象となり、Cry j 2では、DPA1\*0101-DPB1\*0501で提示されるp81-95（配列番号：15）、DRB4\*0101で提示されるp186-200（配列番号：18）、DRB5\*0101で提示されるp66-80（配列番号：14）が選定の対象となる。これらの抗原ペプチドを用いて免疫療法を試みる場合、前もって、患者の末梢血リンパ球に対するこれら抗原ペプチドの増殖応答能を測定し、比較的高い値を示す抗原ペプチドをペプチド免疫療法に用いればよい。

#### 【0043】

本発明の抗原ペプチドは溶解度の向上、治療又は予防効果の強化又は安定性を高める目的でその機能を損なわずにHLAアンカー以外の他のアミノ酸の置換、欠失又は付加により修飾することができる。好適アミノ酸置換は、Ala, Ser, Gluまたはメチルアミノ酸での置換を含むがこれらに限定されない。また、Cys残基はジスルフィド結合を介する二量体を形成したり、あるいは、multi-binderとしての性質を所持することからCys残基を含むペプチドで免疫すると本来は抗原でない部位が認識され、あらたなエピトープとなる可能性がある。この場合は、Cys残基をAla, Ser, Thr, LeuまたはGlu残基で置換することができる。また、Dアミノ

酸、非天然型アミノ酸等による置換を含む。さらにまた、ペプチドのN末端又はC末端にヒスチジンポリマー（例えばヒスチジンが6個繋がったもの）を結合させポリペプチドとして発現できるベクターも開発されており、ニッケルキレートカラムにより、変性剤存在下でもアフィニティー精製が可能であり、本発明に包含される。

## 【0044】

本発明の抗原ペプチドは1分子のアレルゲンあるいは異なる2分子以上のアレルゲン由来であり得る。アレルゲンとしてはブタクサ、カモガヤ、ホソムギ等の草本花粉、スギ、ヒノキ、マウンテンセダーなどの樹木花粉、ダニ、動物、カビ、昆虫、食物などあらゆるタンパクアレルゲンが本発明に含まれる。

## 【0045】

以下に本発明の実施例を記載するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

## 【0046】

## 【実施例】

## 【実施例1】 スギ花粉抗原の精製

Cry j 1の精製は、安枝らの方法[Yasueda, H. et al., J.Allergy Clin.Immunol.(1983) 71:77-86]で行った。Cry j 2の精製は、Cry j 2遺伝子（特開平8-47392号公報）を発現ベクターpQE9 (Qiagen GmbH、ドイツ) に挿入し、大腸菌に遺伝子導入した後発現させ、 $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-アガロースを使用した親和性カラムクロマトグラフィー (Quiagen, Inc. USA) を利用して行った (Komiya, N. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1994) 201: 1021-1028)。

## 【0047】

## 【実施例2】 オーバーラッピングペプチドの合成

Cry j 1の一次構造（国際公開第94/01560号）及びCry j 2（特開平8-47392号公報）の一次構造を基にし、ペプチド合成装置（島津製作所、モデルPSSM-8）を使用して、Cry j 1またはCry j 2の全一次構造をカバーし、15残基からなる10アミノ酸づつが重複するオーバーラッピングペプチドを、Cry j 1に関しては69種類（図1）、Cry j 2に関しては74種類（図2）合成した。ペプチドは濃

度が2mMになるように8M尿素を含むPBSに溶解した。T細胞増殖応答を調査するための培養系にペプチドを添加する場合には、尿素の影響を取り除くために500倍以上の希釈倍率で使用した。

【0048】

〔実施例3〕 抗原提示細胞の樹立

スギ花粉症患者由来末梢血からFicoll-paque（ファルマシア社製）比重遠心法を用いて末梢血リンパ球を分離した。1x10<sup>6</sup>個の末梢血リンパ球にエプステイン・パール（Esptein-Barr／以下ではEBと略す）ウイルスを含むB95-8細胞（マーマセット由来、ATCC CRL1612）培養上清を添加して、末梢血リンパ球に含まれるB細胞にEB-ウイルスを感染させた。200ng/mlのサイクロスポリンA、20% FCS（ウシ胎児血清）を含むRPMI-1640培養液で約20日間培養することによって形質転換したB細胞株を樹立した。

【0049】

〔実施例4〕 T細胞ライン及びT細胞クローンの樹立

4x10<sup>6</sup>個の末梢血リンパ球を20%ヒト血清を添加したRPMI-1640培養液2mlに懸濁し、50μg/mlのCry j 1または2〜10μg/mlのCry j 2抗原存在下で8日間培養し、Cry j 1またはCry j 2を認識するT細胞を活性化した。

【0050】

T細胞ラインを得る場合には、上記の活性化T細胞が出現した時点で培養液を200 U/mlのIL-2（ベーリンガー／マンハイム社製）、15%ヒト血清を含むRPMI-1640培養液に置き換え、この培養液を使用しながらさらに14日間培養することによりCry j 1またはCry j 2を特異的に認識するT細胞を樹立した。

【0051】

T細胞クローンを得る場合には、上記の活性化T細胞が出現した時点で細胞を10cm培養ディッシュに広げ、微量用ピペットで活性化T細胞を1個ずつ選別した。このT細胞1個ずつを前もってマイトマイシンC（協和発酵社製）処理した自己のEB-ウイルス形質転換細胞（1x10<sup>5</sup>／ウエル）を播種した96-ウエルマイクロ培養プレート上の各ウエルに移した。抗原刺激に準じ、50μg/mlのCry j 1または2〜10μg/mlのCry j 2をさらに各ウエルに添加した後、7日間培養した。この7

日間間隔の抗原刺激をさらに2～3回繰り返すことによりCry j 1またはCry j 2を特異的に認識するT細胞クローンを樹立することができた。

#### 【0052】

##### 【実施例5】 Cry j 1及びCry j 2 T細胞エピトープの同定

18名のスギ花粉症患者末梢血リンパ球を、Cry j 1またはCry j 2で刺激して、これらを特異的に認識するT細胞ラインを患者別に樹立した。96-ウエルミクロ培養プレート上で、マイトマイシンC処理した  $5 \times 10^4$  個の自己由来B細胞株、2  $\mu$ Mのオーバーラッピングペプチド、 $2 \times 10^4$  個のT細胞ラインを、0.2mlの15%血清を含むRPMI-1640培養液中で2日間培養し、0.5  $\mu$ Ciの [ $^3$ H] チミジンを添加後さらに18時間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに補集した後、液体シンチレーションカウンターで [ $^3$ H] チミジンの細胞内取り込みを測定した。この操作により、HLA-クラスII分子と共にCry j 1またはCry j 2の抗原情報を認識できるT細胞は増殖し、細胞内に [ $^3$ H] チミジンを取り込む。刺激係数 (Stimulation Index) が2以上であった場合には、添加した抗原ペプチドとして認識されたと判断した。

#### 【0053】

Cry j 1を認識するTラインを用いたT細胞エピトープ部位の同定により、各患者が認識するT細胞エピトープ部位は平均  $9.8 \pm 3.0$  であり、その範囲は  $4 \leq$  エピトープ数  $\leq 15$  であった。他方、Cry j 2では、各患者が認識するT細胞エピトープ部位は、平均  $8.7 \pm 3.3$  であり、その範囲は  $2 \leq$  エピトープ数  $\leq 13$  であった。Cry j 1は、353アミノ酸 (特表平8-502163号)、Cry j 2は379アミノ酸 (特開平8-47392号) で構成されるため、100アミノ酸残基当たり約2.3～2.8箇所のT細胞エピトープ部位が存在することになる。HLA-クラスIIタイプは、患者ごとに異なると考えられるため、認識されるT細胞エピトープは、HLA-クラスIIタイプごとに異なると予測される。Cry j 1あるいはCry j 2分子上に、各患者で認識されるT細胞エピトープ部位を記入する作業を行ない、エピトープマップを作成した。結果を図1及び図2に示す。

#### 【0054】

##### 【実施例6】 T細胞クローンを認識するT細胞エピトープの同定

18名のスギ花粉症患者の中でCry j 1の抗原ペプチドp211-225とp106-120を認識する患者2名〔患者B（以下「PB」と略称する）、患者J（以下「PJ」と略称する）〕と、Cry j 2の抗原ペプチドp66-80、p186-200、p236-250、p341-355を認識する患者3名〔PB、患者C（以下「PC」と略称する）、患者R（以下「PR」と略称する）〕を選定し、これらのスギ花粉症患者の末梢血リンパ球をCry j 1またはCry j 2で刺激してCry j 1またはCry j 2を認識するT細胞クローンを樹立した。4名の患者のHLA-クラスIとクラスIIタイプを以下に示す。PB: A2/24 - B39/55 - Cw7/w3 - DRB1\*1501/0901 - DRB4\*0101 - DRB5\*0101、DQA1\*0102/0301 - DQB1\*0602/0303 - DPA1\*0101/0101 - DPB1\*0501/0201; PJ: A24/- - B61/51 - Cw3/- - DRB1\*1501/0802 - DRB5\*0101、DQA1\*0102/0401 - DQB1\*0602/0402 - DPA1\*-/- - DPB1\*0501/0402; PC: A-2/2 - B54/51 - Cw1/-、DRB1\*0405/1501 - DRB4\*0101 - DRB5\*0101 - DQA1\*0301/0102 - DQB1\*0401/0602 - DPA1\*0202/0202 - DPB1\*0201/0501; PR: A-11/- - B60/35 - Cw7/w3 - DRB1\*0901/1501 - DRB4\*0101 - DRB5\*0101 - DQA1\*0301/0102 - DQB1\*0303/0602 - DPA1\*01/0202 - DPB1\*0201/0201

【0055】

Cry j 1を特異的に認識するT細胞クローンを、PB由来末梢血リンパ球から計35種類、PJ由来末梢血リンパ球から計14種類樹立した。同様に、Cry j 2を特異的に認識するT細胞クローンを、PB由来末梢血リンパ球から計31種類、PC由来末梢血リンパ球から10種類、PR由来末梢血リンパ球から17種類樹立した。これらのT細胞クローンは全てCD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>-</sup>、TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>、TCR $\gamma\delta$ <sup>-</sup>であるため、拘束分子はHLA-クラスII分子であることが判明した。96-ウエルミクロ培養プレート上でマイトマイシンC処理した $5 \times 10^4$ 個の自己由来B細胞株、 $2 \mu\text{M}$ のオーバーラッピングペプチド、 $2 \times 10^4$ 個のT細胞クローンを0.2mlの15%血清を含むRPMI-1640培養液中で2日間培養し、 $0.5 \mu\text{Ci}$ の $[^3\text{H}]$ チミジンを添加後さらに18時間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに補集した後、液体シンチレーションカウンターで $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内取り込みを測定した。この操作で、各T細胞クローンの認識するT細胞エピトープを同定した。作製したCry j 1を認識するT細胞クローンの中で69% (34/49) はT細胞エピトープを含むペプチド刺激

に対して増殖応答を示し、抗原ペプチドを同定できた。同様に、Cry j 2を認識するT細胞クローンの中で、69% (40/58) において抗原ペプチドを同定できた。Cry j 1を特異的に認識するT細胞クローンは、ペプチドp16-30, p61-75, p91-105, p106-120, p146-160, p151-165, p191-205, p211-225, p251-265, p326-340, p331-346、Cry j 2を特異的に認識するT細胞クローンは、ペプチドp16-30, p21-35, p36-50, p66-80, p76-90, p81-95, p151-165, p181-195, p186-200, p236-250, p321-335, p326-340, p336-350, p341-355, p346-360を認識していた。結果を図1と図2 (中央の棒グラフ) にまとめた。

## 【0056】

## 【実施例7】 遺伝子座レベルにおけるHLAクラスII拘束分子の同定

実施例4で樹立したT細胞クローンの増殖応答系に、HLA-クラスII-DR、HLA-クラスII-DQ、またはHLA-クラスII-DPに対して特異的に反応する単クローン抗体を添加して、T細胞の増殖応答を阻止することにより、遺伝子座レベルでのHLAクラスII拘束分子を同定した。

## 【0057】

96-ウエルミクロ培養プレート上で、マイトマイシンC処理した $2 \times 10^4$ 個の自己由来B細胞株、 $2 \mu\text{M}$ のオーバーラッピングペプチド、 $3 \mu\text{g/ml}$ の抗 DR、DQまたはDP単クローン抗体 (ベクトン/ディッキンソン社製)、 $2 \times 10^4$ 個のT細胞クローンを、0.2 mlの15%血清を含むRPMI-1640 培養液中で2日間培養し、 $0.5 \mu\text{Ci}$ の $[^3\text{H}]$ チミジンを添加後さらに18時間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに補集した後、液体シンチレーションカウンターで $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内取り込みを測定した。

## 【0058】

## 【実施例8】 HLAクラスII分子の個々のタイプにおける拘束分子の同定

HLAクラスII遺伝子座レベルでの拘束分子が同定できたT細胞クローンを、DRに関しては、個々のタイプを遺伝子導入したマウスL-細胞、DQまたはDPに関しては、ハプロタイプの一致するB細胞株を抗原提示細胞として用いることにより個々のタイプにおける拘束分子の同定が可能である。

## 【0059】

96-ウェルマイクロ培養プレート上でマイトマイシンC処理した $5 \times 10^4$ 個の上記マウスL細胞またはハプロタイプ的一致するB細胞株、 $2 \mu\text{M}$ のオーバーラッピングペプチド、 $3 \mu\text{g/ml}$ の抗DR、DQ、あるいはDP単クローン抗体（ベクトン/ディッキンソン社製）、 $2 \times 10^4$ 個のT細胞クローンを  $0.2 \text{ ml}$ の 15%血清を含むRPMI-1640培養液中で2日間培養し、 $0.5 \mu\text{Ci}$ の $^3\text{H}$ チミジンを添加後さらに18時間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに補集した後、液体シンチレーションカウンターで $^3\text{H}$ チミジンの細胞内取り込みを測定した。

【0060】

T細胞クローンの増殖応答が観察された場合に、拘束分子が同定できる。解析結果を図3及び図4に示す。

【0061】

〔実施例9〕 T細胞クローンのThタイプの同定

アレルギーの発症にはTh2細胞の関与が想定されている。現在の研究レベルでは、抗原刺激後、T細胞のTh1あるいはTh2細胞への分化が、特定のエピトープペプチドあるいはHLA-クラスII遺伝子座レベルで規定されているのかは、まだ未解決な部分が多い。しかし、抗原ペプチドの選定の際には、ペプチドで刺激後、Th2細胞が優位に誘導される場合には、ペプチド投与によりスギ花粉症が悪化する可能性が十分にある。これらの可能性について調べるために、実施例4で作製したT細胞クローンをT細胞が認識するエピトープペプチドで刺激し、IL-2、IL-4、 $\text{IFN } \gamma$ の産生量を測定することによってThタイプを決定した。

【0062】

24-ウェルマイクロ培養プレート上でマイトマイシンC処理した $1 \times 10^5$ 個の自己由来B細胞株、 $2 \mu\text{M}$ のエピトープペプチド、 $5 \times 10^5$ 個のT細胞クローンを $1 \text{ ml}$ の10%ヒト血清を含むRPMI-1640培養液中で24時間培養した。遠心で細胞を沈澱させ、培養上清を得た。培養上清中のIL-2、IL-4、 $\text{IFN } \gamma$ は市販のELISAキット [IL-2(R&D社製)]、IL-4（メドジェニックス社製）、 $\text{IFN } \gamma$ （大塚アッセイ研究所製）で測定した。

【0063】

各T細胞クローンの産生するIL-2、IL-4、 $\text{IFN } \gamma$ 量及びThタイプを図3及び図



4に示す。Cry j 1を認識するT細胞クローンは、Th2細胞が12、Th1細胞が1、Th0細胞が16であり、Th2の頻度がTh1に比べ多かったがCry j 2を認識するT細胞クローンはTh2細胞が10、Th1細胞が8、Th0細胞が8であり、Cry j 1と異なりTh1、Th2の頻度がほぼ同じであった。個々のT細胞クローンの認識するT細胞エピトープ、拘束分子、Thタイプを比較すると、個々のT細胞クローンによってTh2、Th1、Th0タイプは異なり、同一のエピトープ、同一の抗原提示分子を認識する数個のT細胞クローンにおいて、Th2細胞とTh1細胞の両者が見いだされている。これらの結果は、Cry j 1あるいはCry j 2刺激後のT細胞のTh2、Th1、あるいはTh0細胞への分化は、特定のT細胞エピトープ、特定の拘束分子の組み合わせでは規定されていないことを意味している。つまり、ペプチド免疫療法治療剤に使用するペプチドを選定する場合には、いかなるT細胞エピトープ部位を含むペプチドであってもT細胞を刺激することが可能であると考えられ、ペプチド選定の候補となりうることが判明した。

## 【0064】

## 【実施例10】 CB6F1マウスのT細胞エピトープの同定

8週齢の雄CB6F1マウスをアジュバント（「Imject Alum」PIERCE社製）と共に組み換えCry j 2（rCry j 2）10 $\mu$ gで2週間置きに3回免疫した（ip）。最終免疫から1週間後にマウス3匹から脾細胞を調製し一つにまとめた。96ウエルプレート（ファルコン）1ウエルに対し脾細胞（5 $\times$ 10<sup>6</sup>）を15残基からなる74種類のオーバーラッピングペプチド（0.115 $\mu$ M）と共に0.2mlのRPMI培地（10% FCS、2mM L-グルタミン、50U/ml ペニシリン、50 $\mu$ g/ml ストレプトマイシン）で培養した。対照としてPBS、50 $\mu$ g/ml Cry j 1、0.3 $\mu$ g/ml rCry j 2に対する反応も検討した。各々の試験試薬に対し3ウエル播種し、37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下で3日間培養した。最後の6時間0.5 $\mu$ Ci/ウエルの [<sup>3</sup>H]-チミジンでパルスラベルを行いセルハーベスター（Inotek、バルトールドジャパン株式会社）で細胞をガラスフィルター上に補集し、乾燥した後、液体シンチレーションカウンター（TRI-CARB 4530、パッカードジャパン株式会社）で [<sup>3</sup>H]-チミジンの細胞内取り込みを測定した。

## 【0065】

rCry j 2で免疫したCB6F1マウスは抗原であるrCry j 2に強い反応性を示した

が、もう一つのスギ花粉主要アレルゲンであるCry j 1には反応せず、この系が抗原特異的反応であることが確認された。そして、rCry j 2で免疫したCB6F1マウスは、調べた90種類のオーバーラッピングペプチドのうちp66-80（配列番号：14）とp236-250（配列番号：19）に顕著な応答性を示した。このことからCB6F1マウスにおいてp66-80とp186-200のペプチドが主要T細胞エピトープとして抗原提示に関与していることが示された。ヒトにあってもp66-80（配列番号：14）とp236-250（配列番号：19）のペプチドは主要T細胞エピトープペプチドであることから、CB6F1マウスはスギ花粉に対するペプチド免疫療法に使用するペプチド組成物の有効性を評価するうえで有用なモデル動物になりうることを判明した。

#### 【0066】

【実施例11】 抗原ペプチドp66-80（配列番号：14）のインビボにおける免疫応答

8週齢の雄CB6F1マウス1匹当り生理食塩水に溶解したp66-80（配列番号：14）ペプチド3mgを、5日間隔で2回皮下投与した。対照群としては等容量（100 $\mu$ l）の生理食塩水を同様に投与した。ペプチド投与群及び対照群の動物数は各々8匹とし、2回目のペプチド投与から5日目にアジュバント「Imject Alum」と混合した「rCry j 2」（50 $\mu$ g）で全てのマウスを皮下免疫した。免疫1週間後に各々のマウスから脾細胞を調製した。96ウェルプレート（ファルコン）1ウェルに対し脾細胞（5 $\times 10^6$ ）を「rCry j 2」（3 $\mu$ g/ml）と共に0.2mlのRPMI培地（10% FCS、2mM L-グルタミン、50U/ml ペニシリン、50 $\mu$ g/ml ストレプトマイシン）で培養した。対照として「rCry j 2」を含まない条件下で培養した。<sup>3</sup>H-チミジンによるT細胞増殖の測定は、実施例10に記載された方法に準じて行った。

#### 【0067】

CB6F1マウスに予めp66-80（配列番号：14）を皮下投与しておくで続く「rCry j 2」による抗原刺激に対し、T細胞の免疫応答性が生理食塩水投与群に比べ有意に抑制された（ $p < 0.01$ ）。このことからマウスのモデル系においてp66-80（配列番号：14）はスギ花粉アレルギーに対しペプチド免疫療法の予防効果を有することが示された（図5）。

【0068】

【実施例12】 抗原ペプチドp236-250（配列番号：19）のインビボにおける免疫応答

6週齢の雄CB6F1マウス1匹当り生理食塩水に溶解した3mgのp236-250（配列番号：19）を、5日間隔で2回皮下投与した。対照群としては等容量（200 $\mu$ l）の生理食塩水を同様に投与した。ペプチド投与群及び対照群の動物数は各々8匹とし、2回目のペプチド投与から5日目に「Imject Alum」と混合したrCry j 2（50 $\mu$ g）で全てのマウスを皮下免疫した。免疫1週間後に各々のマウスから脾細胞を調製した。96ウエルプレート（ファルコン）1ウエルに対し脾細胞（ $5 \times 10^6$ ）をrCry j 2（3 $\mu$ g/ml）と共に0.2mlのRPMI培地（10% FCS、2mM L-グルタミン、50U/ml ペニシリン、50 $\mu$ g/mlストレプトマイシン）で培養した。対照として「rCry j 2」を含まない条件下で培養した。<sup>3</sup>H-チミジンによるT細胞増殖の測定は、実施例10に記載された方法に準じて行った。

【0069】

CB6F1マウスに予めp236-250（配列番号：19）を皮下投与しておく続く「rCry j 2」による抗原刺激に対し、T細胞の免疫応答性が生理食塩水投与群に比べ有意に抑制された（ $p < 0.05$ ）。このことからマウスのモデル系においてp236-250（配列番号：19）はスギ花粉アレルギーに対しペプチド免疫療法による予防効果を有することが示された（図6）。

【0070】

以上の実験結果から、従来行われてきたヒトにおけるスギ花粉抽出エキスによる減感作療法がT細胞エピトープを介した作用機作であることが明らかになった。

【0071】

【発明の効果】

本発明によって、アレルギー患者個人ごとのHLAクラスII分子のハプロタイプに適合する抗原ペプチドが、当該患者のペプチド免疫療法剤として利用可能になった。このことによって、患者ごとに最適のペプチド免疫療法を行うことが可能となるので、ペプチド免疫療法の効果が格段に向上することが予想される。更に

、ある特定患者集団内で認識される主要な抗原ペプチドによるペプチド免疫療法ではカバーしきれない患者に対しても有効なペプチド免疫療法治療剤を提供することが可能となった。

【0072】

また、本発明の抗原ペプチドを用いて、アレルギー患者のHLAクラスII分子のタイピングを簡便に行うことが可能となった。

【図面の簡単な説明】

【図1】

Cry j 1のオーバーラップペプチドの配列と患者のT細胞エピトープ部位を示す図である。

【図2】

Cry j 2のオーバーラップペプチドの配列と患者のT細胞エピトープ部位を示す図である。

【図3】

Cry j 1を認識するT細胞クローンが認識するエピトープ部位、該クローンの拘束分、該クローンによるリンホカインの産生、該クローンのThタイプを示す図である。

【図4】

Cry j 1を認識するT細胞クローンが認識するエピトープ部位、該クローンの拘束分、該クローンによるリンホカインの産生、該クローンのThタイプを示す図である。

【図5】

Cry j 2の抗原ペプチドp66-80をCB6F1マウスにあらかじめ投与した場合の、Cry j 2に対するCB6F1マウスの免疫応答能を示す図である。

【図6】

Cry j 2の抗原ペプチドp186-200をCB6F1マウスにあらかじめ投与した場合の、Cry j 2に対するCB6F1マウスの免疫応答能を示す図である。

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Q N R M K L A D C A V G F G S

1            5            10            15

配列番号：2

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

G A T R D R P L W I I F S G N

1            5            10            15

配列番号：3

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

P C V F I K R V S N V I I H G

1            5            10            15

配列番号：4

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

F I K R V S N V I

1        5

配列番号：5

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

H P Q D G D A L T L R T A T N

1        5        10        15

配列番号：6

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

D A L T L R T A T N I W I D H

1        5        10        15

配列番号：7

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

L F F N H H K V M L L G H D D

1        5        10        15

配列番号：8

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

K S M K V T V A F N Q F G P N

1        5        10        15

配列番号：9

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Y A I G G S S N P T I L S E G

1        5        10        15

配列番号：10

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

AFNVENGNATPQLTK

1 5 10 15

配列番号 : 1 1

配列の長さ : 1 1

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

TPQLTKNAGVL

1 5 10

配列番号 : 1 2

配列の長さ : 1 5

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

GKHDCTEAFSTAWQA

1 5 10 15

配列番号 : 1 3

配列の長さ : 1 5

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

SAMLLVPGSKKFVVN



1 5 10 15

配列番号：14

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

VDGIIAAYQNPASWK

1 5 10 15

配列番号：15

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

NNRIWLQFAKLTGFT

1 5 10 15

配列番号：16

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

PEFHLVFGNCEGVKI

1 5 10 15

配列番号：17

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

G I D I F A S K N F H L Q K N

1            5            10            15

配列番号：18

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

A S K N F H L Q K N T I G T G

1            5            10            15

配列番号：19

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

S R A E V S Y V H V N G A K F

1            5            10            15

配列番号：20

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

ATAAAIQLKCSDSMP

1 5 10 15

配列番号：21

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

IQLKCSDSMPCKDIK

1 5 10 15

配列番号：22

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

CKDIKLSDISLKLTS

1 5 10 15

配列番号：23

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

LSDISLKLTSGLIAS

1        5        10        15

配列番号：24

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

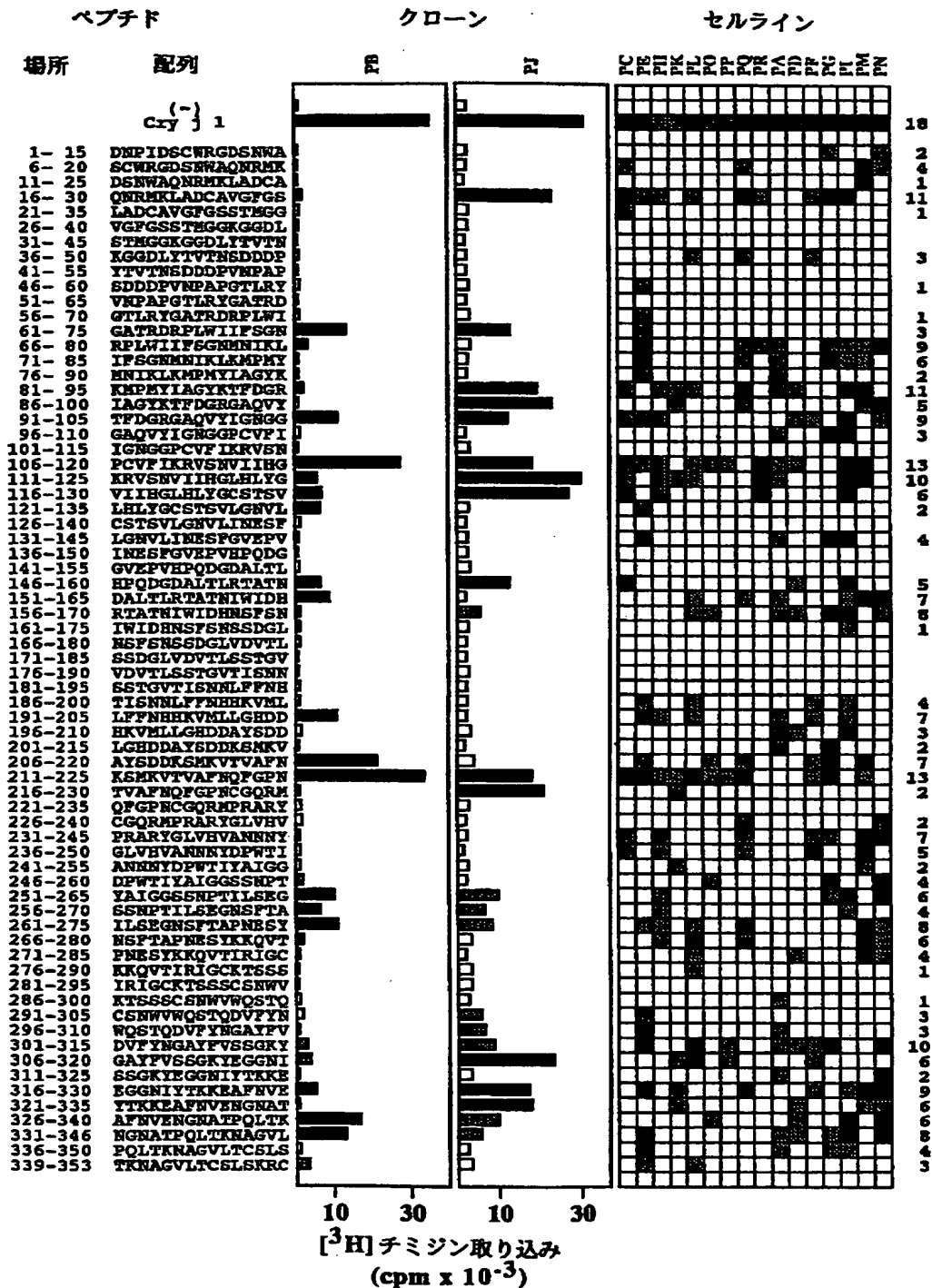
配列

KVTVAFNQF

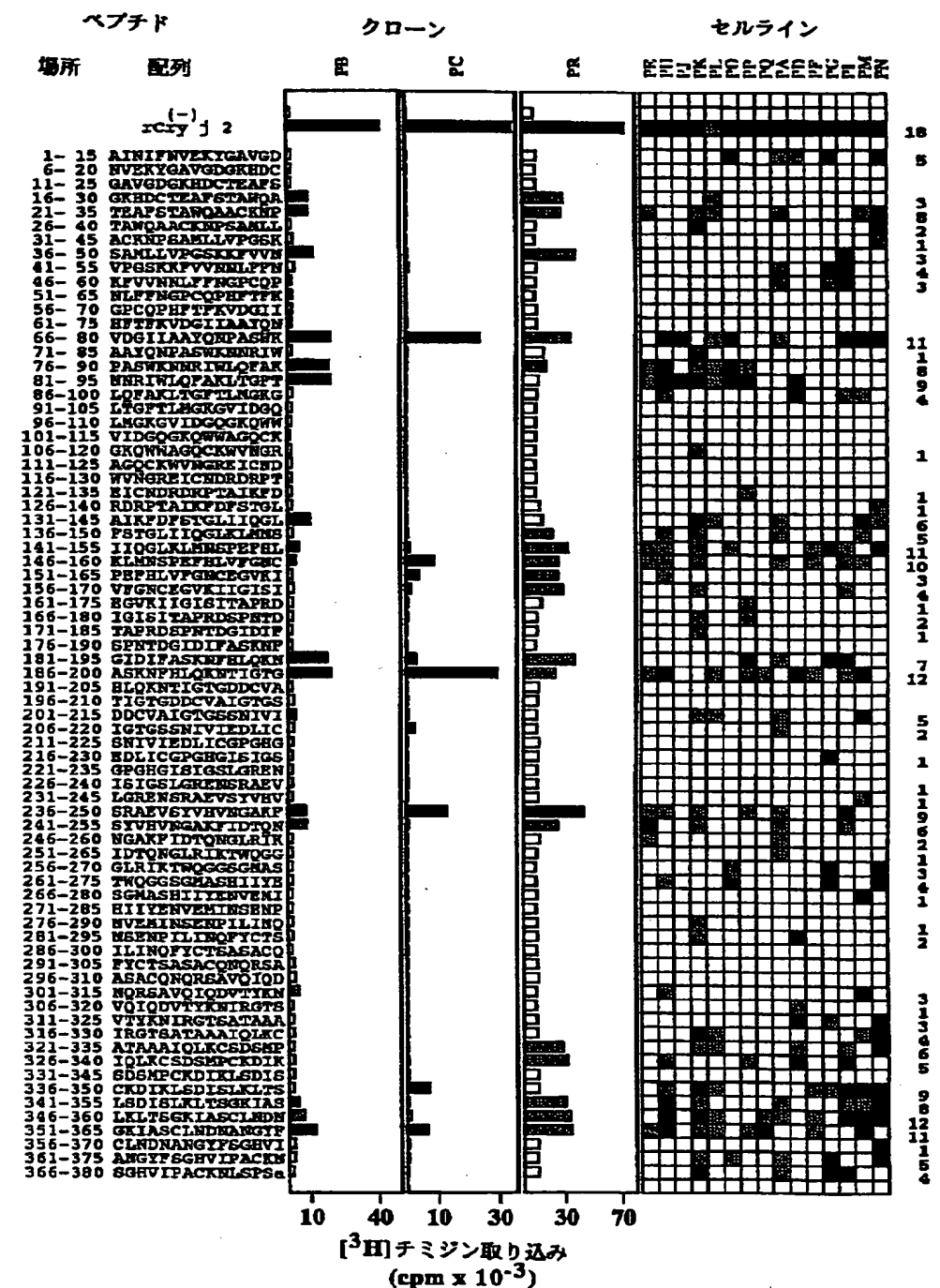
1        5

【書類名】 図面

【図1】



【図2】



【図3】

Cry j 1 を認識する T 細胞クローンの Th タイプ

T 細胞 クローン	エピソード部位		拘束分子	リンフォカイン産生(pg/ml)			Th* タイプ
	番号	位置		IL-2	IFN $\gamma$	IL-4	
PJ4-6	4	16-30	DQA1*0102 DQB1*0602	<31	1500	334	Th0
PB8-1	4	16-30	"	<31	<31	814	Th2
PB9-37	13	61-75	DPA1*0101-DPB1*0501	<31	<31	7760	Th2
PB10-24	13	61-75	"	39	151	4500	Th2
PJ1-27	19	91-105	DQ	32	1220	224	Th0
PB3-27	22	106-120	DRB5*0101	250	332	21000	Th2
PB8-2	22	106-120	"	190	2110	3709	Th0
PB8-3	22	106-120	"	<31	1270	10100	Th0
PB9-39	22	106-120	"	48	51	5120	Th2
PB10-18	22	106-120	"	410	46	7840	Th2
PJ4-29	22	106-120	"	4680	14200	6610	Th0
PJ7-9	22	106-120	"	1370	1040	12200	Th2
PJ5-6	30	145-160	DQA1*0102-DQB1*0602	1500	1170	5920	Th0
PJ5-9	30	145-160	"	1720	825	266	Th0
PB11-21	31	151-165	DRB1*0901	4190	>20000	4510	Th0
PB11-24	31	151-165	"	670	11700	1950	Th0
PB6-37	31	151-165	"	<31	<31	49	Th2
PB1-8	39	191-205	DQA1*0102-DQB1*0602	820	188	1760	Th0
PB9-34	39	191-205	DRB1*0901又はDRB4*0101	<31	86	1680	Th2
PB2-14	43	211-225	DPA1*0101-DPB1*0501	<31	376	2320	Th0
PB7-2	43	211-225	"	84	2740	2080	Th0
PB8-32	43	211-225	"	<31	4870	1840	Th0
PB8-34	43	211-225	"	78	14800	3040	Th0
PB11-23	43	211-225	"	<31	3990	1260	Th0
PB11-26	43	211-225	"	32	1100	6520	Th0
PB4-20	43	211-225	"	<31	<31	133	Th2
PB10-4	43	211-225	"	<31	<31	4170	Th2
PB8-4	51	251-265	DQA1*0102-DQB1*0602	44	36	4050	Th2
PJ4-20	66	326-340	DQA1*0102-DQB1*0602	560	3080	<32	Th1

\* IL-4/IFN $\gamma$  >10 を Th2、IFN $\gamma$ /IL-4 >10 を Th1 その中間を Th0 と定義する。

【図4】

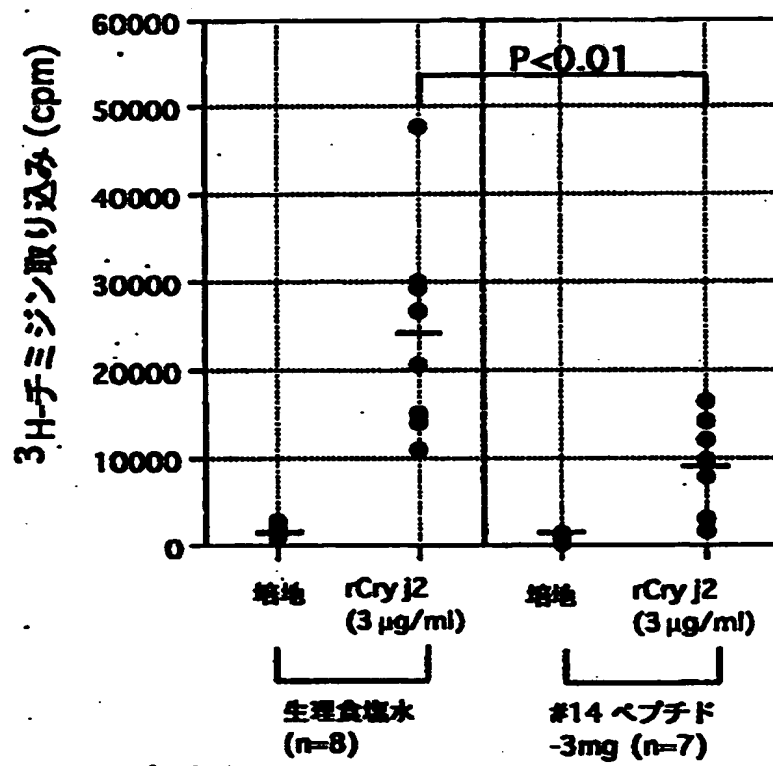
## Cry j 2 を認識する T 細胞クローンの Th タイプ

T 細胞 クローン	エпитロープ部位		拘束分子	リンフォカイン産生(pg/ml)			Th* タイプ
	番号	位置		IL-2	IFN $\gamma$	IL-4	
FB5-29	4	16-30	DRB1*0901又はDRB4*0101	<31	503	97	Th0
FB11-40	4	16-30	"	<31	<31	50	Th2
FB14-4	4	16-30	"	<31	<31	<16	Thp
FB12-33	8	36-50	DRB1*1501	<31	>8000	<16	Th1
FR2-25	8	36-50	"	47	<31	977	Th2
FR5-40	8	36-50	"	1150	1330	355	Th0
FB3-32	14	66-80	DRB5*0101	<31	<31	323	Th2
FB4-21	14	66-80	"	<31	109	239	Th0
FB4-22	14	66-80	"	<31	483	158	Th0
FC1-8	14	66-80	"	<31	2710	32	Th1
FR4-20	14	66-80	"	<31	312	338	Th0
FR3-21	14	66-80	"	<31	<31	338	Th2
FB13-18	17	76-90	DPA1*0101-DPB1*0501	<31	3320	231	Th1
FB11-32	17	76-90	"	138	60	2090	Th2
FR1-20	31	151-165	DRB1*0901	<31	<31	18	Th2
FR4-39	31	151-165	"	<31	<31	<16	Thp
FB14-5	37	181-195	DPA1*0101-DPB1*0201	87	126	469	Th0
FB14-13	37	181-195	"	<31	59	2440	Th2
FB14-34	38	186-200	DRB4*0101	186	420	93	Th0
FC3-40	38	186-200	"	<31	<31	379	Th2
FB5-3	48	236-250	DRB1*1501又はDRB5*0101	2570	>8000	525	Th1
FR2-34	63	321-335	DRB1*0901	57	1990	464	Th0
FR3-30	66	326-340	DQA1*0102-DQB1*0602	<31	106	<80	Th1
FR5-18	66	326-340	"	<31	<31	<16	Thp
FC1-13	68	336-350	DPA1*0202-DPB1*0501	<31	<31	<16	Thp
FB12-8	69	341-355	DQA1*0102-DQB1*0602	<31	3210	<16	Th1
FR5-12	69	341-355	"	<31	<31	2528	Th2
FR2-31	69	341-355	"	<31	<31	332	Th2
FB14-19	70	346-360	"	<31	3730	<16	Th1
FB13-38	70	346-360	"	<31	2020	<16	Th1

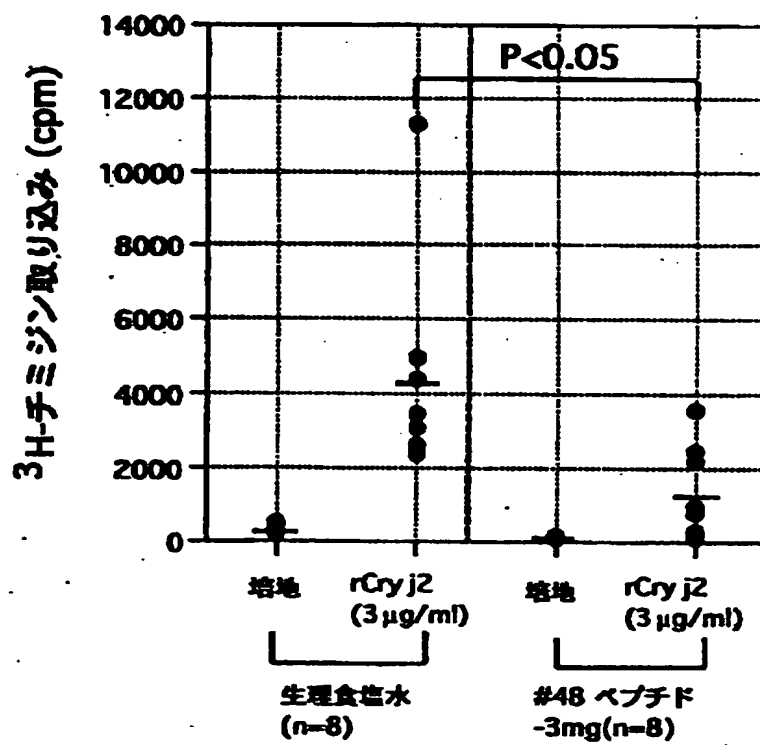
\* IL-4/IFN $\gamma$  >10 を Th2、IFN $\gamma$ /IL-4 >10 を Th1、その中間を Th0、リンフォカイン産生が認められない場合を Thp と定義する。



【図5】



【図6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 アレルギー患者個人ごとに有効なペプチド免疫療法治療剤を提供することを課題とする。また、アレルギー患者個人ごとに有効なペプチド免疫療法治療剤を選択する際に用いられる、患者のHLAクラスII分子のタイピングのための検査用試薬を提供することを課題とする。

【解決手段】 様々なT細胞ラインまたはT細胞クローンを用いて、T細胞エピトープとそれらを拘束する患者のHLAクラスII分子のタイプとの関連づけを多数行った。次に、特定の哺乳動物が認識するT細胞エピトープを同定し、該T細胞エピトープをあらかじめ投与することによって、該特定の哺乳動物において、該T細胞エピトープを含むペプチドに対する免疫反応が有意に抑制されることを見いだした。そのことから、拘束分子の同定されたT細胞エピトープを含むペプチドの中から、患者に固有のHLAクラスII分子のタイプに適合したT細胞エピトープペプチドを選定することによって、患者個人ごとに有効なペプチド免疫療法治療剤を提供することが可能になった。

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】  
【識別番号】 000006138  
【住所又は居所】 東京都中央区京橋2丁目3番6号  
【氏名又は名称】 明治乳業株式会社  
【代理人】 申請人  
【識別番号】 100102978  
【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階  
清水国際特許事務所  
【氏名又は名称】 清水 初志

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006138]

1. 変更年月日	1990年 8月14日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都中央区京橋2丁目3番6号
氏 名	明治乳業株式会社

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**